



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C12Q 1/68, C12N 15/82, A01H 5/00</b>	<b>A1</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 98/36090</b>  (43) Date de publication internationale: 20 août 1998 (20.08.98)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/00308</p> <p>(22) Date de dépôt international: 17 février 1998 (17.02.98)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 97/01821 17 février 1997 (17.02.97) FR</p> <p>(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE POUR LE DEVELOPPEMENT EN COOPERATION (O.R.S.T.O.M.) [FR/FR]; 213, rue Lafayette, F-75480 Paris Cedex 10 (FR). CIMMYT - ABC [MX/MX]; Apartado 6-641, Lisboa 27, Colonia Juarez, Mexico, D.F. 06600 (MX).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): SAVIDAN, Yves [FR/FR]; 11, route de Nîmes, F-30870 Clarensac (FR). GRIMANELLI, Daniel [FR/MX]; Cimmyt, Apartado 6-641, Mexico, D.F. 06600 (MX). PEROTTI, Enrico [IT/MX]; Cimmyt, Apartado 6-611, Mexico, D.F. 06600 (MX). LEBLANC, Olivier [FR/MX]; Cimmyt, Apartado 6-641, Mexico, D.F. 06600 (MX).</p> <p>(74) Mandataires: PEAUCELLE, Chantal etc.; Cabinet Armengaud Aine, 3, avenue Bugeaud, F-75116 Paris (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i></p>	
<p>(54) Title: MEANS FOR IDENTIFYING NUCLEOTIDE SEQUENCES INVOLVED IN APOMIXIS</p> <p>(54) Titre: MOYENS POUR L'IDENTIFICATION DE SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES IMPLIQUEES DANS L'APOMIXIE</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns a method for identifying in Gramineae, more particularly in maize, a nucleotide sequence involved in the apomixis in apomictic plants. It is characterised in that it consists in: identifying in the genome of the Gramineae, by phenotypic analysis, genetic mapping and marking by means of transposons, of the meiotic mutations whereof the corresponding gene is shown to be orthologous to genes involved in the expression of apomixis. The invention also concerns the use of a cloned gene in the Gramineae to identify and isolate the orthologous gene sequence in apomictic plants. The invention further concerns the use or modification of the isolated sequence in apomictic forms for inducing an apomictic development in sexual plants.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>Le procédé de l'invention pour identifier chez les graminées, et plus spécialement chez le maïs, une séquence de nucléotides impliquée dans l'apomixie chez les plantes apomictiques est caractérisé en ce qu'on identifie dans le génome de la graminée, par analyse phénotypique, cartographie génétique et marquage par l'intermédiaire de transposons, des mutations méiotiques dont on montre que le gène correspondant est orthologue de gènes impliqués dans l'expression de l'apomixie. Utilisation du gène cloné chez la graminée pour identifier et isoler la séquence du gène orthologue chez des plantes apomictiques. Utilisation ou modification de la séquence isolée chez les formes apomictiques pour induire un développement apomictique chez des plantes sexuées.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Biélorus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroon	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LJ	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

**Moyens pour l'identification de séquences nucléotidiques  
impliquées dans l'apomixie**

5

L'invention a pour objet des moyens pour identifier, isoler et caractériser des séquences nucléotidiques impliquées dans l'apomixie.

10

Elle vise plus particulièrement un procédé et des outils permettant d'identifier ces séquences dans le génome de plantes apomictiques, puis de les isoler et de les caractériser.

15

Elle se rapporte également aux applications transgéniques réalisées à l'aide de ces séquences, et aux produits obtenus.

20

Dans son acception moderne, l'apomixie, ou agamospermie, regroupe l'ensemble des phénomènes de reproduction asexuée par graine. On trouve des plantes apomictiques chez près de 300 espèces d'angiospermes appartenant à plus de 35 familles. Les différentes formes d'apomixie, qui n'affectent généralement que la reproduction femelle, se caractérisent par l'absence de réduction méiotique, l'absence de fécondation de l'oosphère, et le développement parthénogénétique des

25

embryons. L'apomixie conduit donc à la production de descendants génétiquement identiques à leur plante mère.

La contrepartie naturelle de l'apomixie est la reproduction sexuée, ou amphimixie. Par opposition à  
5 l'apomixie, la reproduction sexuée inclut les processus comprenant à la fois méiose réductionnelle et syngamie.

La méiose répartit au hasard entre les gamètes les chromosomes homologues issus des parents. Elle permet aussi la recombinaison entre chromosomes homologues, par  
10 l'intermédiaire des crossing-overs. La syngamie est la fusion des gamètes. Elle permet de réunir dans un individu une combinaison particulière de l'information génétique issue des deux parents. L'amphimixie produit donc, par recombinaison des génomes parentaux, des  
15 descendants génétiquement uniques.

Dans les cycles de développement des plantes, on observe ainsi l'alternance de deux générations successives, séparées par la méiose et la fécondation. La première génération correspond au sporophyte. Une ou  
20 plusieurs cellules du sporophyte subissent la méiose, produisant les méiospores. Les méiospores se développent en gamétophytes, qui représentent la génération gamétophytique, à l'origine des gamètes. La fusion des gamètes conduit au zygote, qui représente le retour à la  
25 génération sporophytique.

Chez les angiospermes sexuées, le gamétophyte femelle (le sac embryonnaire) se développe dans une

structure multicellulaire très différenciée du sporophyte, l'ovule. Au cours du développement de l'ovule, une cellule particulière, la cellule archésporiale, passe par deux étapes successives: la  
5 mégasporogénèse (formation d'une mégaspore, ou méiospore, réduite à partir d'une cellule archésporiale) et la mégagamétogénèse (formation du gamétophyte femelle à partir d'une mégaspore) pour produire un gamétophyte pluricellulaire qui contient un seul gamète, l'oosphère.  
10 Ce type de développement (type Polygonum) concerne près de 80% des angiospermes. Les différentes formes d'apomixie correspondent à une série de variations sur ce thème.

L'origine de l'embryon permet une première  
15 subdivision entre deux formes fondamentales d'apomixie. Dans les cas d'embryonnie adventive, les embryons se différencient directement à partir de cellules somatiques du nucelle ou du tégument de l'ovule. Il n'y a donc pas d'alternances des générations sporophytiques et  
20 gamétophytiques. L'apomixie gamétophytique, par contre, se caractérise par la formation d'un gamétophyte femelle non-réduit, et le développement parthénogénétique de l'embryon à partir de l'oosphère. Dans la suite du texte, toute référence à l'apomixie se rapportera à l'apomixie  
25 gamétophytique.

On observe deux grands types d'apomixie gamétophytique, qui diffèrent par l'origine du gamétophyte femelle. Chez les formes aposporiques, le sac embryonnaire non-réduit est dérivé d'une cellule somatique de l'ovule, généralement du nucelle. Chez les formes diplosporiques, il est issu d'une cellule générative, la cellule archésporiale. L'apoméiose recouvre à la fois aposporie et diplosporie. Il existe en fait une grande diversité de processus conduisant à la formation d'un gamétophyte non-réduit.

Chez les angiospermes sexués, le gamétophyte mâle (le grain de pollen) contient deux spermatozoïdes. L'un féconde l'oosphère, donnant naissance à l'embryon, tandis que l'autre s'unit au noyau de la cellule centrale, à l'origine de l'albumen. L'embryon et l'albumen sont donc tous deux sexués. On parle de double fécondation, caractéristique propre des angiospermes. Chez la majorité des plantes apomictiques, l'embryon se développe sans fécondation, mais l'albumen demeure sexué. On parle de pseudogamie, ou apomixie pseudogame, lorsque la fécondation de la cellule centrale est nécessaire au développement de l'albumen, et d'apomixie autonome lorsqu'à la fois l'embryon et l'albumen se développent sans fécondation.

Au niveau embryonnaire, l'apomixie correspond donc bien à une reproduction asexuée par graine. Elle résulte d'une somme de composantes clairement identifiables: l'apoméiose, ou formation d'un sac

embryonnaire sans réduction méiotique, et la parthénogenèse, ou formation d'un embryon sans fécondation de l'oosphère. Apoméiose et parthénogenèse assurent l'alternance des générations sporophytiques et gamétophytiques, mais sans alternance des phases nucléaires: sporophyte et gamétophyte conservent le même niveau de ploïdie.

Au niveau d'une plante, cependant, l'apomixie est en fait un mode de reproduction mixte, associant amphimixie et reproduction asexuée. En effet, l'apomixie est en règle générale un phénomène facultatif: il apparaît dans les descendance de plantes apomictiques des individus "hors-types", c'est-à-dire génétiquement différents de leur plante mère. Pour qu'il y ait développement apomictique au sens strict, il faut que les deux conditions de non-réduction et non-fécondation soient réunies. Des hors-types peuvent apparaître si l'une ou les deux conditions ne sont pas remplies. en fonction de la réalisation ou de l'échec de la méiose et de la fécondation, les classes de descendance possibles chez une plante apomictique facultative sont les suivantes:

	Fécondation	Non-fécondation
Méiose	$n+n$	$n+0$
Apoméiose	$2n+n$	$2n+0$

Dans la définition des hybrides de type "n+n", ou "2n+n", etc...., le premier terme désigne l'état du gamétophyte, réduit (n) ou non réduit (2n). Le deuxième  
5 terme traduit la présence ou l'absence de fécondation de l'oosphère. La catégorie "2n+0" représente donc l'apomixie *stricto sensu*, et la catégorie "n+n" l'amphimixie. La catégorie "2n+n" conduit à une accumulation génomique, et la catégorie "n+0" à  
10 l'haploïdisation de la plante mère. Les proportions respectives de ces différentes catégories sont variables d'une espèce à l'autre, et même d'une plante à l'autre au sein d'une espèce donnée. Dans la suite de la description, les références à l'apomixie concernent aussi  
15 bien les formes apomictiques facultatives que les formes apomictiques obligatoires produisant exclusivement des descendance de type 2n+0.

Le déterminisme génétique de l'apomixie est encore très mal compris. On admet aujourd'hui que les  
20 angiospermes à reproduction asexuée descendent d'ancêtres à reproduction sexuée, et que le passage d'une forme de reproduction à une autre relève d'un déterminisme génétique. L'apomixie résulterait donc de l'expression de gènes ou d'allèles d'apomixie, c'est-à-dire présents et  
25 exprimés chez les plantes apomictiques, mais absents ou non fonctionnels chez les plantes sexuées.



La grande majorité des travaux sur le contrôle génétique de l'apomixie concernent l'apoméiose, et plus fréquemment l'aposporie. Il existe actuellement un consensus assez large sur le principe d'une hérédité mendélienne de l'aposporie (voir références (1) et (2), les références bibliographiques étant données en fin de description). On dispose de peu de connaissances sur la diplosporie, mais les résultats existants (3, 4) montrent que l'hypothèse admise chez les plantes aposporiques est sans doute applicable aux plantes diplosporiques. Dans ces différents modèles, le mode d'action des gènes concernés reste une énigme. Ces analyses tendent cependant à montrer que le gène responsable de l'apoméiose pourrait à lui seul déclencher l'ensemble du processus apomictique.

L'apomixie suscite un grand intérêt eu égard à son potentiel pour l'amélioration des plantes. L'utilisation de l'apomixie chez les principales plantes cultivées représenterait une manière simple de fixer l'hétérosis. Il s'agit potentiellement d'une révolution quant à la manipulation des systèmes de reproduction.

De nombreux programmes ont vu le jour, dont l'objectif est de caractériser les "gènes d'apomixie", et de les introduire dans les plantes cultivées.

Les travaux les plus anciens, et probablement les plus avancés, utilisent des plantes naturellement

apomictiques. Les allèles correspondants y sont présents, et fonctionnels. Leur transfert dans des espèces cultivées importantes peut se faire soit par l'intermédiaire de croisements interspécifiques entre une  
5 espèce cultivée et un apparenté apomictique, soit en isolant les gènes correspondants, pour les introduire ensuite dans l'espèce cible par transgénie ( (5) ; (6) ; (7) et (8) ).

Une autre approche, en développement rapide,  
10 consiste à générer l'apomixie chez des espèces sexuées, par différentes méthodes de mutagenèse. *Arabidopsis thaliana* est le modèle le plus utilisé ((9), (10) et (8)). Des travaux équivalents sont en cours chez le pétunia, *Petunia hybrida* (10), et *Hieracium* (8). Dans  
15 tous ces cas de figures, l'hypothèse fondamentale est qu'un contrôle génétique simple est en cause, et que le transfert, ou la modification d'un nombre très faible d'allèles fournit les conditions suffisantes à l'expression de l'apomixie. On entend ici l'apomixie  
20 comme la résultante des événements précédemment mentionnés: échec de la méiose et parthénogenèse.

Les travaux des inventeurs dans ce domaine les ont conduits à rechercher chez le maïs des gènes orthologues de celui ou ceux impliqués dans l'expression  
25 de l'apomixie chez les espèces du genre *Tripsacum*, genre apparenté au maïs. Dans la description et les revendications, on entend, par "gènes orthologues", des gènes qui auraient divergé d'un gène commun, ou de gènes

paralogues, en même temps que les espèces qui les portent. Les gènes visés ont les mêmes fonctions par rapport à l'apomixie.

Le genre *Tripsacum* appartient à la tribu des Andropogonées. C'est le seul apparenté connu du genre *Zea* sur le continent américain (4) et (11) ont réalisé l'étude la plus complète des modes de reproduction chez *Tripsacum*. Ces travaux ont permis de préciser les points suivants:

- 10                   - toutes les accessions polyploïdes se reproduisent par apomixie diplosporique,
- la non-réduction chez les formes apomictiques est principalement de type *Antennaria*, avec occurrence rare de type *Taraxacum*,
- 15                   - les sacs embryonnaires chez les formes diplosporiques sont issus directement des mégasporocytes par 3 mitoses successives,
- l'échec de la méiose chez les formes diplosporiques est associé à l'absence de dépôts de callose autour des mégasporocytes,
- 20                   - l'analyse d'une population F1 entre maïs et une forme diplosporique de *Tripsacum* indique une hérédité simple de l'apoméiose,
- différents allèles détectés par des sondes
- 25                   moléculaires de maïs ont été cartographiés à proximité du

locus responsable de l'apoméiose ; il s'agit des sondes umc28, csu68, et umc62,

- ces sondes permettent d'établir une relation partielle d'homologie entre le chromosome responsable de l'apoméiose chez *Tripsacum* et la partie distale du bras long du chromosome 6 chez le maïs.

Les travaux des inventeurs les ont conduits à proposer et à montrer que les gènes responsables de l'apomixie chez *Tripsacum* possèdent un ou plusieurs gènes orthologues dans le génome des graminées sexuées, en particulier dans le génome du maïs. Cette approche a permis de développer une stratégie générale conduisant à identifier, puis cloner des séquences nucléotidiques responsables de l'apomixie, et de mettre au point de nouveaux outils pour sa réalisation.

L'invention a donc pour but de fournir un procédé pour identifier chez une graminée, et plus spécialement chez un maïs, un gène orthologue d'un gène impliqué dans l'apomixie.

Elle a également pour but de fournir un procédé d'isolement de la séquence de ce gène.

L'invention vise en outre l'utilisation de cette séquence pour isoler les séquences de gènes orthologues correspondantes chez des plantes apomictiques et les applications de ces séquences en transgénèse.

Elle a en outre pour but un procédé permettant de confirmer la relation fonctionnelle entre les

séquences isolées chez des plantes apomictiques et l'expression phénotypique de l'apomixie.

Le procédé selon l'invention, pour identifier chez une graminée, et plus spécialement chez un maïs, une  
5 séquence de nucléotides orthologue de séquence responsable de tout ou partie du développement apomictique chez une forme apomictique, est caractérisé en ce qu'on cartographie dans le génome de la graminée, plus spécialement celui d'un maïs, des mutations  
10 possédant une expression phénotypique proche ou similaire à celle observée chez une forme apomictique, pour identifier celles de ces mutations qui apparaissent orthologues de gènes impliqués dans l'apomixie.

On identifie ici un phénotype apparenté sur la  
15 base de quatre caractéristiques des formes diplosporiques, qui peuvent être observées soit indépendamment, soit en conjonction: (a) les mutations sont spécifiques de la mégasporogenèse et n'affectent pas la fonction reproductive mâle, (b) elles conduisent à la  
20 formation de gamètes non-réduits à partir d'une cellule archésporiale, (c) elles se caractérisent par l'absence de dépôts de callose autour des cellules mère de la mégaspore, (d) les points de contrôle qui agissent normalement lors de la formation du sac embryonnaire  
25 semblent inactifs, et les sacs embryonnaires sont

normalement formés malgré l'échec d'une étape au cours de la mégasporogenèse.

La référence dans le procédé défini ci-dessus à l'identification de séquences de nucléotides englobe  
5 l'identification de loci ou de gènes dans un mode de mise en oeuvre du procédé de l'invention, ou cartographie dans le génome de la graminée, plus spécialement celui d'un maïs, des mutations méiotiques pour identifier celles qui apparaissent orthologues de gènes impliqués dans  
10 l'apomixie.

L'invention vise notamment un procédé d'identification chez une graminée, plus spécialement chez un maïs, d'une séquence de gènes orthologues de celle du gène contrôlant l'apoméiose chez les formes  
15 apomictiques, caractérisé en ce qu'on étudie l'expression phénotypique et qu'on localise la position de différentes mutations méiotiques dans le génome de la graminée, plus spécialement d'un maïs, à l'aide de marqueurs moléculaires capables de localiser les loci responsables  
20 de l'apoméiose chez ladite forme apomictique.

D'une manière générale, les mutations localisées selon l'invention sont clonées et séquencées.

Les inventeurs ont mis en particulier en évidence que les gènes impliqués dans l'expression de  
25 l'apomixie chez *Tripsacum* possèdent un ou plusieurs orthologues dans le génome du maïs.

L'utilisation selon l'invention d'un même jeu de marqueurs chez maïs et *Tripsacum*, a permis d'identifier des gènes candidats présentant à la fois (1) la même localisation génomique que les gènes contrôlant la diplosporie, en ce sens qu'ils sont situés dans la même région chromosomique d'un segment qui, chez le maïs, est homéologue de celui contrôlant la diplosporie chez *Tripsacum*, et (2) un phénotype apparenté, fonction de critères précédemment mentionnés. De manière préférée, la localisation concerne les loci *elongate* et *afd* dans le génome du maïs.

Le procédé de l'invention est encore caractérisé en ce qu'il comprend l'étiquetage à l'aide de transposons des mutations méiotiques localisées. L'invention vise en particulier l'étiquetage à l'aide de transposons du locus *elongate*.

L'utilisation de transposons dont on connaît la séquence permet de créer une mutation pour un gène dont on ne connaît que l'expression phénotypique. L'insertion du transposon dans le gène que l'on cherche à isoler se caractérise souvent par la perte de sa fonction. Dans le cas d'allèle récessifs, elle se caractérise fréquemment par l'apparition du phénotype récessif chez des plantes hétérozygotes. Des transposons particulièrement intéressants comprennent les éléments transposables des type Mutator, ou Ac/Ds.

On procède avantageusement au clonage et séquençage des mutations localisées.

Ainsi, un gène muté peut être isolé en repérant le site d'insertion du transposon, les différents loci où  
5 ont été insérés des transposons étant clonés par les techniques classiques d'analyse Mendélienne et de biologie moléculaire (12) et (13), et séquencés si on le souhaite.

Dans le cas par exemple du site correspondant  
10 plus particulièrement au locus *elongate*, on caractérise tout d'abord phénotypiquement le site pour l'expression de l'allèle *ell*. Il est ensuite localisé par cartographie génétique, et sa position comparée à celle des loci contrôlant la diplosporie chez *Tripsacum*. Les loci sont  
15 ensuite marqués par l'intermédiaire de transposons, isolés, puis séquencés.

L'invention vise également l'utilisation d'au moins une partie d'une séquence telle que définie ci-dessus pour identifier, puis isoler, la séquence des  
20 gènes orthologues chez des formes apomictiques.

L'invention vise, en tant que telles, les séquences nucléotidiques isolées. Ces séquences sont caractérisées en ce qu'elles sont orthologues de séquences responsables de tout ou partie du développement  
25 chez une forme apomictique. L'invention comprend également les séquences homologues, en termes de fonction, de celles identifiées ci-dessus.



L'invention vise notamment une séquence de nucléotides de ce type correspondant au gène muté d'elongate.

5 Les acides nucléiques contenant une ou plusieurs séquences telles que définies ci-dessus associées à des séquences régulatrices nécessaires à l'expression dans le matériel végétal font également partie de l'invention.

10 L'invention comprend également les vecteurs de clonage et d'expression comportant de tels acides nucléiques ainsi que les hôtes cellulaires contenant ces vecteurs, par exemple *Agrobacterium tumefaciens*.

15 L'invention vise également l'utilisation de telles séquences, le cas échéant en conjonction avec d'autres allèles caractéristiques des formes apomictiques, pour transformer le génome d'un matériel végétal, cellules végétales, plantes, à divers stades de développement, et graines, afin de leur conférer un développement apomictique. Les dits allèles correspondent  
20 à des gènes autres que les gènes orthologues visés par l'invention.

L'invention concerne notamment un procédé de production de plantes apomictiques, caractérisé en ce qu'on utilise une séquence du gène muté d'elongate telle  
25 que définie ci-dessus.

Ce matériel végétal transformé, en tant que tel, entre dans le champ de l'invention et est caractérisé par le fait qu'il renferme dans son génome au moins la partie de ladite séquence impliquée dans un développement apomictique, le cas échéant en conjonction avec d'autres allèles caractéristiques des formes apomictiques.

Les cellules, plantes et graines visées appartiennent à la famille des graminées. Il s'agit en particulier de maïs.

La transformation du matériel végétal, cellules, plantes et graines, est obtenue en opérant avantageusement selon les techniques classiques de transgénie.

A titre d'exemple, pour l'obtention de plantes de maïs transgéniques.

**A. Obtention et utilisation de cal de maïs comme cible pour la transformation génétique.**

La transformation génétique du maïs, quelle que soit la méthode employée (électroporation; *Agrobacterium*, microfibres, canon à particules), requiert généralement l'utilisation de cellules indifférenciées en divisions rapides ayant conservé une aptitude à la régénération de plantes entières. Ce type de cellules compose le cal friable embryogène (dit de type II) de maïs.

Ces cals sont obtenus à partir d'embryons immatures de génotype H1 II ou (A188 x B73) selon la méthode et sur les milieux décrits par Armstrong (1994). Les cals ainsi obtenus sont multipliés et maintenus par repiquages successifs tous les quinze jours sur le milieu d'initiation.

Des plantules sont ensuite régénérées à partir de ces cals en modifiant l'équilibre hormonal et osmotique des cellules selon la méthode décrite par Vain et al. (1989). Ces plantes sont ensuite acclimatées en serre où elles peuvent être croisées ou autofécondées.

#### B. Utilisation du canon à particules pour la transformation génétique du maïs.

15

Le paragraphe précédent décrit l'obtention et la régénération des lignées cellulaires nécessaires à la transformation ; on décrit ici une méthode de transformation génétique conduisant à l'intégration stable des gènes modifiés dans le génome de la plante. Cette méthode repose sur l'utilisation d'un canon à particules ; les cellules cibles sont des fragments de cals décrits dans le paragraphe 1. Ces fragments d'une surface de 10 à 20 mm<sup>2</sup> ont été disposés, 4 h avant bombardement, à raison de 16 fragments par boîte au centre d'une boîte de petri contenant un milieu de culture identique au milieu d'initiation, additionné de

0,2 M de mannitol + 0,2 M de sorbitol. Les plasmides portant les gènes à introduire sont purifiés sur colonne Qiagen, en suivant les instructions du fabricant. Ils sont ensuite précipités sur des particules de tungsten  
5 (M10) en suivant le protocole décrit par Klein et al, Nature, 1987, 327, pages 70-73. Les particules ainsi enrobées sont projetées vers les cellules cibles à l'aide du canon et selon le protocole décrit par J. Finer (1992).

10 Les boîtes de cals ainsi bombardées sont ensuite scellées à l'aide de Scellofrais<sup>®</sup>, puis cultivées à l'obscurité à 27°C. Le premier repiquage a lieu 24 h après, puis tous les quinze jours pendant 3 mois sur milieu identique au milieu d'initiation  
15 additionné d'un agent sélectif. Les agents sélectifs utilisables consistent généralement en composés actifs de certains herbicides (Basta<sup>®</sup>, Round up<sup>®</sup>,) ou certains antibiotiques (Hygromycine, Kanamycine...).

On obtient après 3 mois ou parfois plus tôt,  
20 des cals dont la croissance n'est pas inhibée par l'agent de sélection, habituellement et majoritairement composés de cellules résultant de la division d'une cellule ayant intégré dans son patrimoine génétique une ou plusieurs copies du gène de sélection. La fréquence d'obtention de  
25 tels cals est d'environ 0,8 cal par boîte bombardée.

Ces cals sont identifiés, individualisés, amplifiés puis cultivés de façon à régénérer des plantules. Afin d'éviter toute interférence avec des cellules non

transformées toutes ces opérations sont menées sur des milieux de culture contenant l'agent sélectif.

Les plantes ainsi régénérées sont acclimatées puis cultivées en serre où elles peuvent être croisées ou  
5 autofécondées.

### C. Utilisation d'*Agrobacterium tumefaciens* pour la transformation génétique du maïs.

10 La technique utilisée est celle décrite par Ishida et al. (Nature Biotechnology, 1996, 14 : 745-750) ou par Horsch et al., Science, 1984, 223, pages 496-498.

L'invention fournit ainsi des moyens pour  
15 disposer d'une population de plantes apomictiques et possédant des éléments transposables actifs.

En particulier, elle fournit les moyens pour induire un développement apomictique chez une plante sexuée et notamment chez le maïs.

20 Dans une autre application selon l'invention, on utilise au moins une partie d'une séquence telle que définie ci-dessus, pour identifier et isoler la séquence du locus orthologue chez des formes apomictiques.

Les sondes d'hybridation élaborées à partir  
25 desdites séquences, ainsi que les amorces utilisables dans les techniques PCR, font donc partie de l'invention.

De telles sondes et amorces correspondent notamment à celles élaborées à partir de la séquence d'*elongate*.

Les techniques d'hybridation ou de PCR sont  
5 avantageusement réalisées selon les méthodes classiques.

L'invention vise également un procédé d'identification et d'isolement d'un gène responsable de la diplosporie chez les *Tripsacum* apomictiques, caractérisé en ce qu'on utilise au moins une partie de la  
10 séquence du locus *elongate*.

Le procédé de l'invention est encore caractérisé en ce qu'on utilise la séquence isolée chez les *Tripsacum* apomictiques pour l'analyse fonctionnelle de la relation entre cette séquence et l'expression de  
15 l'apomixie. On utilise en particulier un procédé de mutagénèse, comme illustré dans les exemples, permettant de confirmer la relation entre la séquence isolée chez les *Tripsacum* apomictiques à partir de la séquence du gène *elongate* et l'expression phénotypique de l'apomixie.

20 Selon l'invention, on confirme en particulier la relation entre ladite séquence et l'expression de l'apoméiose.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention sont donnés dans les exemples qui suivent.  
25 Dans ces exemples, il est fait référence aux figures 1 à 5, qui représentent respectivement :

- la figure 1, la cartographie génétique du segment chromosomique contrôlant la diplosporie chez un *Tripsacum* tétraploïde apomictique, et la comparaison avec des plantes diploïdes sexuées chez *Tripsacum* et le maïs,
- 5       - la figure 2, la construction d'une population de cartographie pour la mutation *el1*, (*elongate*),
- la figure 3, la construction d'une population de mutagenèse pour le marquage du locus *elongate*,
- la figure 4, la caractérisation phénotypique  
10 des mégasporocytes chez des plantes homozygotes pour l'allèle *el1* et des plantes de maïs possédant l'allèle sauvage au locus *elongate*, et la comparaison avec des formes sexuées et apomictiques chez *Tripsacum*.
- la figure 5, la construction d'une population  
15 de mutagenèse chez des hybrides maïs-*Tripsacum*, permettant l'analyse fonctionnelle de la relation entre la séquence isolée chez les plantes apomictiques et l'expression de l'apomixie.

20       Exemple 1 : Cartographie génétique de l'apoméiose chez *Tripsacum*

On rapporte ci-après la réalisation d'une carte génétique du segment de chromosome contrôlant l'apoméiose chez des formes apomictiques et sexuées du genre *Tripsacum*.

25       1) Matériels

- Cartographie des *Tripsacum* diploïdes: les deux parents utilisés sont des plantes diploïdes sexuées ( $2n=36$ ) de la collection ORSTOM-CIMMYT, maintenue sur la station expérimentale de Tlaltizapan, Etat de Morelos, au Mexique. Il s'agit d'un *Tripsacum maizar* Hern. and Randolph, accession CIMMYT #99-1114 et d'un *Tripsacum dactyloides* var. meridionale de Wet and Timothy, accession CIMMYT #575-5136. La population comprend 175 plantes F1, parmi lesquelles 56 ont été utilisées pour la cartographie.

- Cartographie de l'apoméiose: la population de cartographie comprend 232 plantes F1 maïs-*Tripsacum*. Le parent maïs (H1) est un hybride de maïs ( $2n=2x=20$ ) entre deux lignées CIMMYT (CML 135 par CML 139). L'autre est un *Tripsacum dactyloides* tétraploïde et apomictique ( $2n=4x=72$ ), accession CIMMYT #65-1234. La plante apomictique a été utilisée comme mâle.

## 2) Méthodes

. Analyse des modes de reproduction : Elle est effectuée d'après Leblanc et al. (4)

. Détection de marqueurs moléculaires de type RFLP liés à l'apoméiose:

La stratégie suivie correspond globalement à celle décrite par Micheltore et al. (14) pour la détection de marqueurs moléculaires liés à une réponse phénotypique déterminée.



Les sondes ont été obtenues auprès de l'Université de Missouri, Columbia.

Une centaine de sondes RFLP ont été choisies sur les cartes génétiques existantes pour le maïs, pour  
5 obtenir une densité d'environ 20-30 cM entre deux marqueurs (voir (4), annexe 4). Différentes cartes de référence ont été utilisées : la carte UMC (University of Missouri Colombia ; Maize DataBase, carte UMC95), une  
carte de l'Université de Cornell (15) et différentes  
10 cartes produites au CIMMYT (16). Un test de  $\chi^2$  a été utilisé pour détecter les liaisons potentielles, et les taux de recombinaisons ont été évalués d'après Allard (17). Le parent donneur du segment contrôlant l'apoméiose étant une plante tétraploïde hétérozygote, trois  
15 conditions sont nécessaires à la détection d'une liaison entre la diplosporie et un allèle RFLP : (1) existence d'un polymorphisme RFLP entre les deux parents à ce locus, (2) hétérozygotie pour cet allèle chez *Tripsacum*, (3) l'allèle doit être simplex chez le tétraploïde,  
20 c'est-à-dire différenciable des 3 autres.

#### - Cartographie des diploïdes

On a utilisé une population de cartographie F1 entre deux parents hétérozygotes appartenant à deux espèces distinctes. Les méthodes de cartographie sont  
25 telles que décrites par Ritter et al (18).

### 3) Résultats

- Identification de marqueurs RFLP liés à l'apoméiose

5           La figure 1 représente la cartographie génétique du segment chromosomique contrôlant l'apoméiose, et la comparaison avec les plantes diploïdes sexuées chez *Tripsacum* et le maïs. "Apo" correspond au locus responsable de l'apoméiose. La position d'umc71 sur  
10 le chromosome 6 du maïs est indiquée de manière approximative, l'allèle sur le chromosome 6 ayant été retiré des dernières versions de la carte UMC. La carte a été développée à partir de 52 plantes de la population F1 entre maïs et *Tripsacum*. Dans cette population, méiose et  
15 diplosporie sont en ségrégation 1:1 (24 plantes apomictiques contre 28 plantes sexuées,  $\chi^2 = 0,31$ ,  $P = 0,6$ ). Quatre-vingt quatre sondes, sélectionnées sur la carte UMC pour couvrir aussi largement que possible le génome du maïs, ont été testées. 90% d'entre elles  
20 détectent au moins un polymorphisme entre maïs et *Tripsacum*. Trois sondes, présentant un allèle polymorphe et spécifique du bulk apomictique, ont été testées sur l'ensemble de la population F1. Un allèle, détecté par la sonde umc28, s'est avéré lié à l'apoméiose. Dans une  
25 deuxième étape, quatorze sondes proches du locus umc28 sur la carte UMC ont été testées. Quatre d'entre elles, umc71, umc62, csu68, et cdo202, détectent des allèles

RFLP qui sont à la fois liés à la diplosporie, et en complète co-ségrégation entre eux.

- Cartographie comparée entre diploïdes sexués et tétraploïdes apomictiques

5 Les cinq marqueurs liés à la diplosporie ont été cartographiés sur la population diploïde. Tous ont pu l'être sur un même parent (575-5136). On remarque que les cinq marqueurs sont tous strictement liés chez la plante tétraploïde, mais sont séparés par des taux de  
10 recombinaison importants à la fois chez le parent diploïde et le maïs.

- Cartographie comparée maïs-*Tripsacum*:

Les sondes détectant des allèles liés au segment chromosomique contrôlant la diplosporie chez  
15 *Tripsacum* détectent toutes des allèles appartenant au même groupe de liaison sur la carte du maïs. Il s'agit du bras long du chromosome 6. Certaines d'entre elles détectent aussi des allèles dans d'autres régions du génome, en particulier les chromosomes 3 et 8. Les  
20 localisations sur la carte maïs des différentes sondes liées à l'apoméiose sont données dans le tableau suivant:

	Clones	Localisation
	-----	
	UMC38*	6L; 8L; 3L
5	UMC62	6L
	UMC71	6L; 8L
	UMC28	6L
	CSU68	6L; 8L; 3L
	CDO202	6L; 8L, 3L

10

\*: non liée à la diplosporie, mais appartient au même groupe de liaison.

Exemple 2 : Identification de gènes orthologues chez le maïs

15 On a recherché chez le maïs, les gènes qui conduisent chez *Tripsacum* à l'expression de l'apoméiose. On a donc cherché à identifier chez le maïs des gènes candidats présentant à la fois (1) la même localisation génomique que l'apoméiose et (2) un phénotype apparenté à

20 l'apoméiose.

Il existe de très nombreux mutants de méiose chez le maïs. Les critères phénotypiques retenus dans le choix des gènes candidats ont été les suivants : (1) la présence de cellules archésporiales clairement

25 différenciées (2) l'absence totale d'induction de la méiose chez ces cellules, ou l'échec de celle-ci à un stade précoce (3) la capacité à produire un gamétophyte fonctionnel indépendamment de l'échec de la méiose, (4) l'absence ou pour le moins une baisse très marquée des

dépôts de callose autour de la cellule mère de la mégaspore. Parmi les candidats potentiels, c'est à dire présentant tout ou partie des caractéristiques précédemment citées, ceux dont la position dans le génome du maïs était inconnue ou imprécise ont été cartographiées en utilisant comme loci de références ceux détectés par les sondes utilisées pour la cartographie de l'apoméiose chez *Tripsacum*.

#### - Matériels et Méthodes

Les travaux dont les résultats sont rapportés ci-après ont été réalisés sur *elongate (el1)*, qui est un mutant de méiose récessif (19). Chez les plantes homozygotes pour le locus *el1*, les chromosomes restent décondensés durant la métaphase et l'anaphase de première division, entraînant diverses anomalies chromosomiques dont une proportion importante de gamétophytes non réduits (de 30 à 70 %, fonction entre autres du fond génétique dans lequel on place la mutation). La fécondation par le pollen d'une plante normale conduit à un embryon triploïde, et à un albumen pentaploïde déficient.

La localisation précise du locus *elongate* était inconnue jusqu'à l'invention. On savait cependant qu'il appartenait au bras long du chromosome 8 du maïs. Il n'était donc pas localisé directement sur le bras de chromosome de maïs identifié par Leblanc et al. comme

homéologue de celui contrôlant l'apoméiose. Localisé sur le chromosome 8, il appartient cependant potentiellement à un segment qui se trouve être dupliqué entre la partie distale du bras long du chromosome 6 et certaines parties du chromosome 8 (15).

La figure 2 décrit la construction d'une population de cartographie pour la mutation *ell* (*elongate*). Trois plantes F1 de génotype hétérozygote *Ell/ell* ont été rétrocroisées sur trois plantes homozygotes *ell/ell*. Pour chaque famille, 50 plantes ont été mises au champ, autofécondées, et évaluées pour leur phénotype. Les graines *Ell/ell* sont attendues normales, les graines *ell/ell* présentant un albumen malformé. Afin de confirmer les phénotypes *elongate*, dix à vingt embryons à l'intérieur des graines présentant un albumen déficient ont été prélevés, et analysés en cytométrie de flux en utilisant le protocole proposé par Galbraht et al (20). La mutation *ell* a été obtenue auprès du Maize Genetic Stock Center, Urbana, Illinois, sous la forme de graines issues de l'autofécondation de plantes homozygotes pour l'allèle *ell* dans un fond génétique par ailleurs indéterminé. On a utilisé la lignée homozygote de phénotype sauvage, W23, pour la construction de la population. La détection de liaison et l'estimation des taux de recombinaison ont été obtenues à l'aide du logiciel Mapmaker 2.0, pour machintosh.

- Comparaison de l'expression phénotypique des plantes apoméiotiques et *elongate*

L'expression phénotypique de la mutation *elongate* dans les cellules archésporiales de plantes homozygotes *el1/el1* a été analysée par des techniques de cytoembryologie précédemment décrites par Leblanc et al. (11). Des inflorescences immatures ont été récoltées sur quatre types de matériels: (1) des *Tripsacum* diploïdes sexués, (2) des *Tripsacum* tétraploïdes apomictiques, 10 accessions décrites dans Leblanc et al (11), (3) une lignée de maïs homozygote *El1/El1* de phénotype sauvage (W23), et (4) une lignée homozygote *el1/el1*.

. Etiquetage et isolement de la séquence du locus *elongate* à l'aide d'éléments transposables.

15 L'étiquetage par transposon consiste à utiliser des transposons dont on connaît la séquence afin de créer une mutation pour un gène dont on ne connaît que l'expression phénotypique. L'insertion du transposon dans le gène que l'on cherche à isoler se caractérise souvent 20 par la perte de sa fonction. Dans le cas d'allèle récessifs, elle se caractérise fréquemment par l'apparition du phénotype récessif chez des plantes hétérozygotes. Le gène muté peut ensuite être lui-même cloné en repérant le site d'insertion du transposon. Le 25 gène muté peut alors être lui-même isolé en repérant le site d'insertion du transposon, les différents loci où

ont été insérés des transposons étant clonés par les techniques classiques d'analyse Mendélienne et de biologie moléculaire. Les expériences ci-après ont été réalisées avec le système Mutator (21).

5           La population utilisée pour l'étiquetage du locus *elongate* à l'aide de transposons est schématisée sur la figure 3 (f: fréquence d'apparition; [EL] et [el]: phénotypes dominant et récessif ; *El\** : allèle marqué. Les plantes homozygotes pour la mutation récessive sont  
10 croisées sur des plantes homozygotes pour l'allèle sauvage, *El1*. Dans la population de gamètes produite par la parent *EL1/El1*, on retrouve une ou plusieurs mutations au locus *elongate*. Lorsque l'insertion conduit à la perte de la fonction de cet allèle, on retrouve alors quelques  
15 plantes F1 de génotype *el1/El1*, mais de phénotype *el1*. Le gène est alors marqué.

#### Résultats:

##### - Cartographie du locus *elongate*:

Dans les populations en ségrégation, les  
20 phénotypes *el1* et *El1* ségrègent en proportions 1:1 ( $\chi^2=0.5$  ;  $P=0.6$ ). Différentes sondes RFLP appartenant aux chromosomes 3, 6, et majoritairement 8 ont été testées avec trois enzymes de restriction, *EcoR1*, *BamH1*, et *HindIII*, sur 50 plantes de la population. Les sondes  
25 détectant des polymorphismes intéressants ont ensuite été analysées sur 100 individus supplémentaires. *Umc28*, *umc62*, et *umc71* ne présentent pas d'allèles polymorphes



liés au *elongate* avec les trois enzymes testées. *Csu68* et *cdo202*, par contre, détectent des allèles liés au locus *elongate*. Les liaisons entre les trois loci, estimées en pourcentage de recombinaison, sont les suivantes:

5

	cdo 202	csu68
<i>elongate</i>	9.3	7.4
<i>csu68</i>	1.9	

- Caractérisation phénotypique:

La figure 4 permet la comparaison des développements des cellules archesporiales chez ces différents types de matériels (A: cellule mère de la mégaspore chez W23, un maïs de génotype *El1/El1*; B: cellule mère de la mégaspore chez un maïs homozygote *el1/el1*; C: cellule mère de la mégaspore chez un *Tripsacum* diploïde sexué; D: cellule mère de la mégaspore chez un *Tripsacum* tétraploïde apomictique). Les stades de développement observés ont été identifiés et synchronisés entre les différentes formes observées en se basant sur la taille et la morphologie des téguments externes de l'ovule (11). Pour les formes sexuées chez maïs et *Tripsacum*:, on observe des caractéristiques de développement tout à fait similaires : même morphologie à la fois des cellules et des noyaux (entre autre: cellule mère de la mégaspore de formes rectangulaires, parois marquées épaisses, dépôts de callose très marqués au

niveau des parois cellulaires, depuis la cellule mère des mégaspores jusqu'à la formation de la mégaspore). On observe cette même similarité en comparant les formes diplosporiques chez *Tripsacum* aux plantes de maïs homozygotes *El1/El1*: même morphologie à la fois des noyaux et des cellules (développement direct de la cellule mère de la mégaspore en sac embryonnaire, paroi cellulaires fines, noyaux très clairement différents de ceux observés chez les formes sexuées, et très comparables entre les formes diplosporiques chez *Tripsacum* et les plantes *el1/el1* chez le maïs, et absence ou très faibles dépôts de callose au niveau la cellule mère de la mégaspore).

- Etiquetage par transposon du locus *elongate*:

Une population de 12500 plantes F1 produites selon la figure 3 ont été mises au champs sur la station expérimentale du CIMMYT à Tlatizapan, Mexique. Les 12500 plantes ont été fécondées par un hybride de maïs dépourvu de Mutator actif (hybride CML135 \* CML 62). Les épis des 12500 ont été observés à maturité afin de détecter ceux exprimant la mutation *elongate* bien qu'hétérozygotes à ce locus. Pour les plantes présentant des albumens déficients, les embryons correspondants ont été analysés en cytométrie de flux. Deux plantes identifiées comme TTEl-5 et TTEl-7 ont été identifiées comme possédant des albumens déficients associés à un embryon triploïde. Ces plantes expriment le phénotype *elongate* chez des plantes hétérozygotes *el1/El1*. Chez ces plantes l'allèle sauvage

au locus a été étiqueté par un des transposons de type Mutator. Les graines produites par croisement de ces deux plantes par l'hybride CML135\*CML62 forment une population dans laquelle cet allèle marqué ségrège au locus  
5 elongate: la moitié des plantes issues de ce croisement sont de génotype *el1/El* (*el1* issu de la plante TTE1, *El* issu de CML135\*CML62), l'autre moitié étant de génotype *El1\*/El*, où *El1\** est l'allèle marqué par le transposon et  
10 le gène au locus elongate en analysant la co-ségrégation des différentes copies des éléments transposables présents chez ces plantes et du locus elongate tel que localisé avec les sondes RFLP mentionnées ultérieurement.

- Exemple 3: obtention et procédé d'utilisation  
15 d'une population de mutagenèse permettant de confirmer la  
relation entre l'allèle candidat et l'expression  
phénotype de tout ou partie du développement apomictique

Le schéma général et les matériels utilisés sont présentés figure 5. Les lignées contenant des  
20 éléments Mutator ont été obtenues auprès de M. Freeling, Université de Californie à Berkeley. Les plantes dihaploïdes BC2-28 utilisées ici sont celles précédemment décrites par Leblanc et al (6). Il s'agit de plantes apomictiques, possédant un génome haploïde de chacun des  
25 deux parents d'origine maïs et *Tripsacum*. Nous avons

utilisé ces plantes pour introduire des éléments *Mutator* dans un matériel apomictique.

Une population de mille plantes BC2-28 apomictiques a tout d'abord été constituée, à partir  
5 d'une unique plante dihaploïde apomictique, et en sélectionnant dans ses descendances les plantes de types  $2n+0$ . Nous créons ainsi mille copies du même génotype polyhaploïde apomictique. Ces mille plantes ont été croisées par les stocks *Mutator*. Dans la descendance  
10 obtenue, nous avons sélectionné pour les plantes hors-types  $2n+n$ , c'est-à-dire ayant incorporé un génome issu des stocks *Mutator*. Ces stocks possèdent environ 200 copies des différents types de *Mutators*. On espère donc en récupérer en moyenne 100 copies dans les plantes  
15 apomictiques. La sélection des plantes BC2-28 et des hors-types BC3-38 apomictiques s'est faite sur un simple critère morphologique. Les dihaploïdes possèdent en effet un phénotype très reconnaissable, et très différent de celui qui résulte de l'accumulation d'un génome de maïs supplémentaire (6). Au total, environ 35000 graines (BC2-  
20 28 x *Mutators*) ont été obtenues. L'ensemble a été mis au champ sur la station expérimentale du CIMMYT à Tlaltizapan, état de Morelos, au cours de l'été 1996. Les hors-type  $2n+n$  ont été sélectionnés un mois après  
25 germination. Environ 7500 plantes  $2n+n$  ont été obtenues, soit près de 20% de hors-types. Cette population a été recroisée par un hybride de maïs (CML135\*CML62) dépourvu d'éléments *Mutator* actifs, produisant une population

d'environ 150000 graines, représentant la population de génétique inverse.

Cette population représente un matériel idéal pour analyser l'effet d'une séquence donnée sur l'expression  
5 de l'apomixie. En effet, les allèles *Tripsacum* responsables de l'expression de ce caractère sont ici en condition simplex (une seule copie dans le génome). Il suffit donc pour vérifier la relation allèle-fonction de contrôler l'effet phénotypique de l'insertion d'un  
10 transposon dans cette séquence. Si la mutation induit une perte de fonction, on a alors établi avec certitude la relation séquence-fonction. Les séquences à la fois des transposons et du gène étudié étant connues, on peut identifier les plantes mutées pour cet allèle par des  
15 techniques de PCR classiques.

## Références bibliographiques

- 5 (1) Savidan, Y., 1982 Nature et hérédité de l'apomixie chez *Panicum maximum* Jacq. Université of Paris XI.
- (2) Nogler, G. A., 1984a Genetics of apospory in apomictic *Ranunculus auricomus* V. Conclusions. Bot Helvetica 94: 411-422.
- 10 (3) Mogie, M., 1988 A model for the evolution and control of generative apomixis. Biol J Linnean Soc 35: 127-153.
- (4) Leblanc, O., M. D. Peel, J. G. Carman and Y. Savidan, 1995a Megasporogenesis and megagametogenesis in several *Tripsacum* species (Poaceae). Am J Bot 82: 15 57-63.
- (5) Hanna, W., M. Dujardin, P. Ozias-Akins, E. Lubbers and L. Arthur, 1993 Reproduction, cytology, and fertility of pearl Millet X *Pennisetum squamulatum* BC4 plants. J Hered 84: 213-216.
- 20 (6) Leblanc, O., D. Grimanelli, N. Islam-Faridi, J. Berthaud and Y. Savidan, 1996 Reproductive behaviour in maize-*Tripsacum* polyhaploid plants; implications for the transfer of apomixis into maize. J Hered 87: 108-111.
- 25 (7) Kindiger, B., V. Sokolov and I. V. Khatypova, 1996 Evaluation of apomictic reproduction in a set of 39 chromosome maize-*Tripsacum* backcross hybrids. Crop sci 36: 1108-.

(8) Jefferson, R. A., and R. Bicknell, 1996 The potential impact of apomixis: a molecular genetic approach. In *The impact of plant molecular genetics*, edited by B. W. S. Sobral. Birkhäuser, Boston.

5 (9) Koltunow, A. M., R. A. Bicknel and A. M. Chaudhury, 1995 Apomixis: molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. *Plant Physiol* 108: 1345-1352.

(10) Ramulu, K. S., P. Dijkhuis, A. Pereira, G. C. Angenent, M. M. Van Lookeren Campagne and J. J. M. Dons, 1997 EMS and transposon mutagenesis for the isolation of apomictic mutants in plants. In *Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement*. Kluwers academic Publishers, Amsterdam.

15 (11) Leblanc, O., D. Grimanelli, D. González de León and Y. Savidan, 1995b Detection of the apomictic mode of reproduction in maize-Tripsacum hybrids using maize RFLP markers. *Theor Appl Genet* 90: 1198-1203.

(12) Walbot, V., 1992 Strategies for mutagenesis and gene cloning using transposon tagging and T-DNA mutagenesis. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43: 49-82.

(13) Freeling, M. and Walbot, V. (eds) , 1994 *The Maize Handbook*. Springer Verlag, New York.

25 (14) Michelmore, R. W., I. Paran and R. V. Kesseli, 1991 Identification of markers linked to

disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genome regions by using segregating populations. Proc Natl Acad Sci USA. 88: 9828-9832.

5           (15) Ahn, S.N., and S.D. Tanksley, 1993  
Comparative linkage maps of the rice and maize  
genomes. Proc Natl Acad Sci USA 90: 7980-7984.

          (16) Ribaut, J. M., D. A. Hoisington, J. A.  
Deutsch, C. Jiang and D. Gonzalez-de-Leon, 1996  
10   Identification of quantitative trait loci under  
drought conditions in tropical maize. 1. Flowering  
parameters and the anthesis-silking interval. Theor  
Appl Genet 92: 905-914.

          (17) Allard, R. W., 1956 Formulas and tables to  
15   facilitate the calculation of recombinaison values in  
heredity. Hilgardia 24: 235-278.

          (18) Ritter, E., C. Gebhardt and F. Salamini,  
1990 Estimation of recombination frequencies and  
construction of RFLP linkage maps in plants from  
20   crosses between heterozygous parents. Genetics 125:  
645-654.

          (19) Rhoades, M. M., and E. Dempsey, 1966  
Induction of chromosome doubling at meiosis by the  
elongate gene in maize. Genetics 54: 505-522.

25           (20) Galbraith, D. W., K. R. Harkins, J. M.  
Maddox, N. M. Ayres, D. P. Sharma and E. Firoozabady,  
1983 Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle  
in intact plant tissues. Science 220: 1049-1051.



(21) Robertson, D. S., 1980 The timing of Mu activity in maize. Genetics 94: 969-978.

## REVENDEICATIONS

1/ Procédé pour identifier chez une graminée,  
5 et plus spécialement chez un maïs, une séquence de  
nucléotides orthologue de séquence responsable de tout ou  
partie du développement apomictique chez une forme  
apomictique, caractérisé en ce qu'on cartographie dans le  
génom de la graminée, plus spécialement celui d'un maïs,  
10 des mutations présentant un phénotype proche ou similaire  
de celui observé chez une forme apomictique, pour  
identifier celles qui apparaissent orthologues de gènes  
impliqués dans l'apomixie.

2/ Procédé selon la revendication 1,  
15 caractérisé en ce qu'on cartographie dans le génome de la  
graminée, plus spécialement d'un maïs, des mutations  
méiotiques pour identifier celles qui apparaissent  
orthologues de gènes impliqués dans l'apomixie.

3/ Procédé selon la revendication 2,  
20 caractérisé en ce qu'on localise la position de  
différentes mutations méiotiques dans le génome de la  
graminée, plus spécialement d'un maïs, à l'aide de  
marqueurs moléculaires capables de localiser les loci  
responsables de l'apoméiose chez ladite forme  
25 apomictique.

4/ Procédé selon la revendication 3,  
caractérisé en ce qu'on utilise des marqueurs

moléculaires capables de localiser les loci responsables de la diplosporie chez *Tripsacum*.

5/ Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que ladite localisation concerne les loci *elongate* et *afd*.

6/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend en outre l'étiquetage par transposon des mutations méiotiques localisées.

10 7/ Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'étiquetage par transposon est réalisé au locus *elongate* à l'aide des éléments transposables du type Mutator ou Ac/Ds.

15 8/ Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le clonage et le séquençage des mutations localisées.

9/ Procédé selon la revendication 6 ou 7, caractérisé en ce qu'on clone les gènes mutés, après avoir repéré le site d'insertion du transposon par analyse de ségrégation, et qu'on les séquence si souhaité.

10/ Séquences de nucléotides, caractérisées en ce qu'elles sont orthologues de séquences responsables de tout ou partie du développement apomictique chez une forme apomictique et les séquences homologues.

11/ Séquence de nucléotides selon la revendication 10, caractérisée en ce qu'elle correspond au gène muté d'elongate.

5 12/ Acides nucléiques contenant une ou plusieurs séquences telles que définies dans la revendication 10 ou 11, associées à des séquences régulatrices nécessaires à l'expression dans un matériel végétal.

10 13/ Vecteurs de clonage et d'expression comportant des acides nucléiques selon la revendication 12.

14/ Hôtes cellulaires contenant un vecteur selon la revendication 13.

15 15/ Utilisation d'une séquence selon la revendication 10 ou 11, le cas échéant en conjonction avec d'autres allèles caractéristiques des formes apomictiques, pour introduction dans le génome d'un matériel végétal, cellules végétales, plantes à divers stades de développement et graines, afin de leur conférer  
20 un développement apomictique.

16/ Cellule végétale de graminées, en particulier de maïs, caractérisée en ce qu'elle comporte dans son génome au moins la partie d'une séquence selon la revendication 10 ou 11 impliquée dans un développement  
25 apomictique.

17/ Plante de la famille des graminées, en particulier maïs, caractérisée en ce qu'elle comporte

dans son génome au moins la partie d'une séquence selon la revendication 10 ou 11, impliquée dans un développement apomictique.

18/ Graine de graminées, en particulier de  
5 mais, caractérisée en ce qu'elle comporte dans son génome au moins la partie d'une séquence selon la revendication 10 ou 11 impliquée dans un développement apomictique.

19/ Procédé de production de plantes  
apomictiques, caractérisé en ce qu'on utilise une  
10 séquence de nucléotides selon la revendication 11.

20/ Utilisation d'au moins une partie d'une séquence selon la revendication 10 ou 11 pour identifier et isoler les séquences des loci orthologues chez des formes apomictiques.

15 21/ Sondes d'hybridation et amorces moléculaires caractérisées en ce qu'elles sont élaborées à partir d'une séquence selon la revendication 10 ou 11.

22/ Sondes d'hybridation et amorces moléculaires selon la revendication 18, caractérisées en  
20 ce qu'elles sont élaborées à partir de la séquence d'*elongate*.

23/ Procédé d'identification et d'isolement de gènes responsables de l'apoméiose chez les *Tripsacum* apomictiques, caractérisé en ce qu'on utilise au moins  
25 une partie de la séquence du locus *elongate*.

24/ Procédé d'utilisation d'une population de mutagénèse pour confirmer la relation entre une séquence isolée chez *Tripsacum* selon la revendication 20 et l'expression de l'apomixie.

1/6

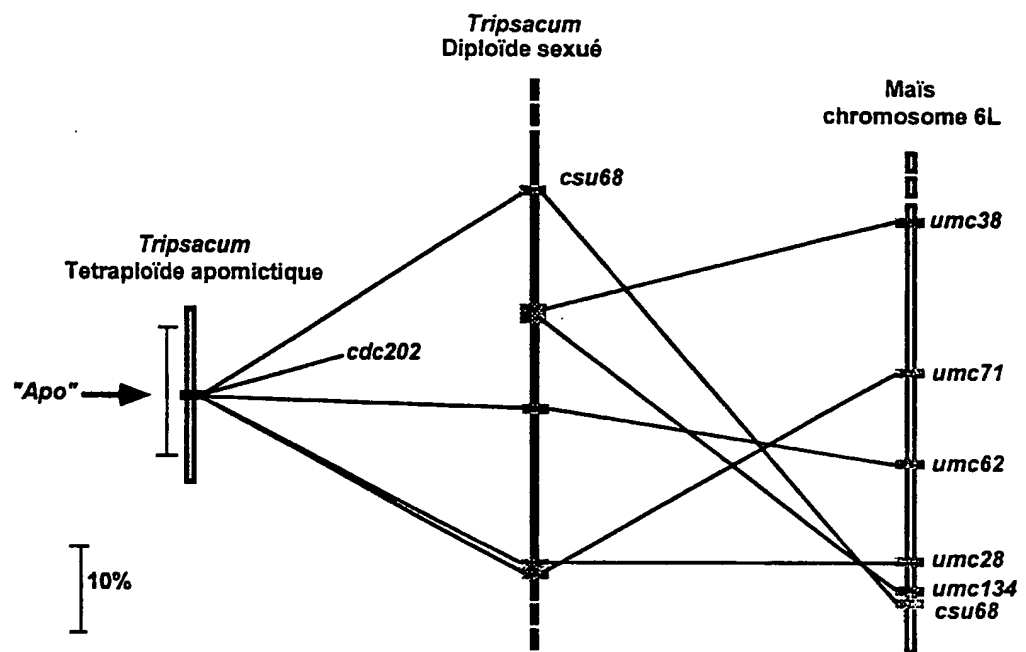


Figure 1

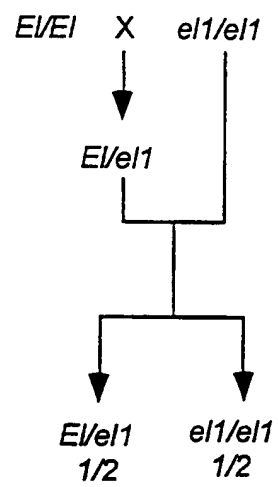


FIGURE 2



3/6

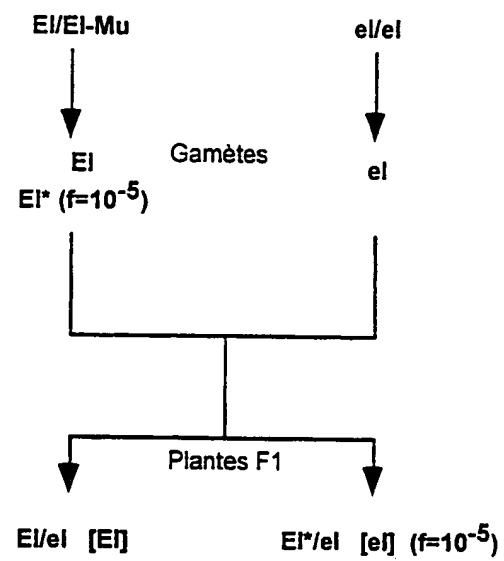


FIGURE 3

4/6



FIGURE 4A

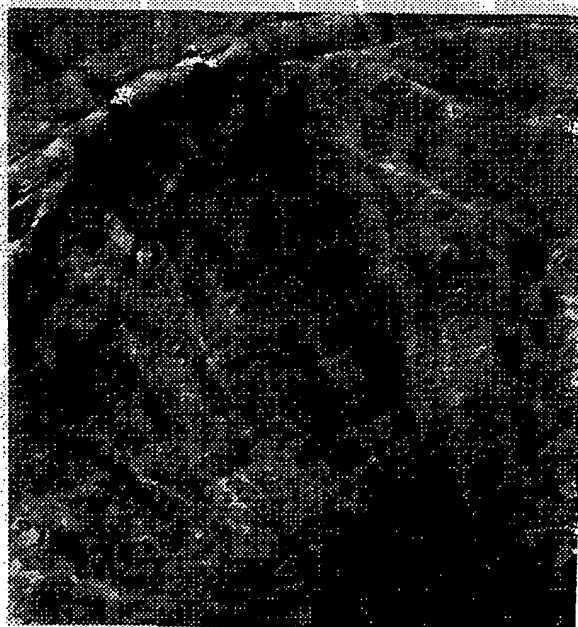


FIGURE 4B

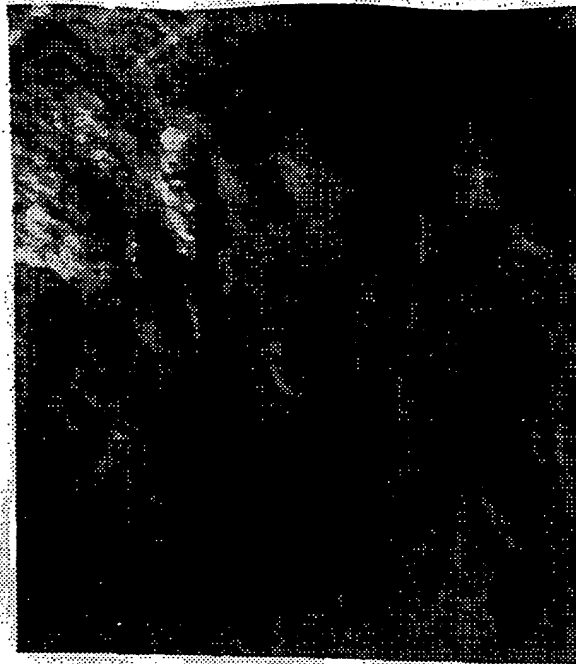


FIGURE 4C



FIGURE 4D

6/6

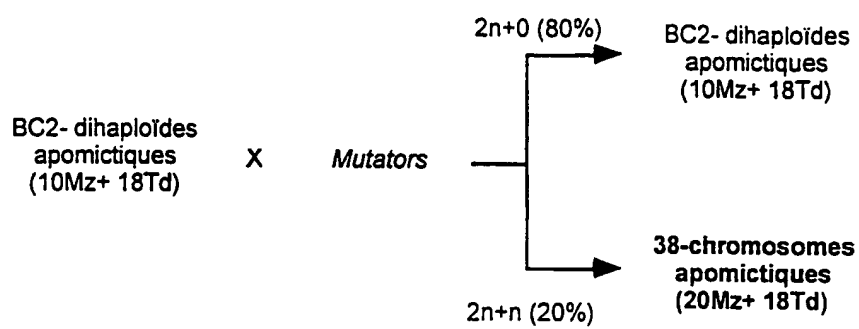


FIGURE 5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte Jonal Application No

PCT/FR 98/00308

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12Q1/68 C12N15/82 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12Q C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KINDIGER B ET AL: "assignment of a gene (s) conferring apomixis in Tripsacum to a chromosome arm: Cytological and molecular evidence" GENOME, vol. 39, no. 6, December 1996, pages 1133-41, XP002047140 see the whole document	1-3
A	---	5-10, 15-22
X	PESSINO S ET AL: "Identification of a maize linkage group related to apomixis in Brachiaria" THEORETICAL AND APPLIED GENETICS, vol. 94, no. 3-4, 1997, pages 439-444, XP002047141 see the whole document	1-3
A	---	5-10, 15-22
-/-		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 June 1998

Date of mailing of the international search report

14/07/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Osborne, H

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Application No.

PCT/FR 98/00308

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEBLANC O ET AL: "Reproductive behavior in maize-tripsacum polyploid plants: implications for the transfer of apomixis into maize" JOURNAL OF HEREDITARY, vol. 87, 1966, pages 108-11, XP002069546 see the whole document	1-3
X	LUBBERS ET AL: "Molecular markers shared by diverse apomictic Pennisetum species" THEOR APPL GENET, vol. 89, 1994, pages 636-42, XP002069547 see the whole document	1-3
X	LEBLANC O ET AL: "Detection of the apomictic mode of reproduction in Maize-Tripsacum hybrids using maize RFLP" THEORETICAL AND APPLIED GENETICS, vol. 90, no. 7-8, 1995, pages 1198-1203, XP002047142 see the whole document	1-3
A		5-10, 15-22
A	KOLTUNOW A M: "APOMIXIS: EMBRYO SACS AND EMBRYOS FORMED WITHOUT MEIOSIS OR FERTILIZATION IN OVULES" PLANT CELL, vol. 5, October 1993, pages 1425-1437, XP002040861	1-3
A	KINDIGER B ET AL: "A comparison of apomictic reproduction in eastern gammagrass (Tripsacum dactyloides (L.) L.) and Maize - Tripsacum hybrids" GENETICA, vol. 97, no. 1, 1996, pages 103-104, XP002047143 see the whole document	1-3, 5-10, 15-22
A	RICHARDS A: "Genetic variability in obligate apomicts of the genus Taraxacum" FOLIA GEOBOTANICA PHYTOTAXONOMICA, vol. 31, no. 3, 1996, pages 405-414, XP002047144 see the whole document	1-3, 5-10, 15-22
P,X	WO 97 11167 A (US GOVERNMENT) 27 March 1997 see page 18 - page 49	5,8-10, 15-22
6 P,X	WO 97 10704 A (US GOVERNMENT) 27 March 1997 see page 1 - page 14; claims 1-14	10-22
3	-/--	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 98/00308

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>CHOMET P: "Transposon tagging with mutator"  1994 , SPRINGER-VERLAG , NEW YORK, USA, PP 243-49; IN: M. FREELING &amp; V. WALBOT XP002047145  see the whole document  ---</p>	5-10
A	<p>CHANDLER V: "Overview of cloning genes using transposon tagging"  1994 , SPRINGER-VERLAG , NEW YORK USA, PP. 647-52; IN : M. FREELING &amp; V. WALBOT XP002047146  see the whole document  ---</p>	5-10
T	<p>GRIMANELLI D ET AL: "Mapping diplosporous apomixis in tetraüplöid Tripsacum: one gene or several genes"  HEREDITY,  vol. 80, 1988,  pages 33-39, XP002069584  see the whole document  -----</p>	1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. l. Application No

PCT/FR 98/00308

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9711167 A	27-03-1997	US 5710367 A AU 7367396 A	20-01-1998 09-04-1997
WO 9710704 A	27-03-1997	AU 7367496 A	09-04-1997



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den .e Internationale No

PCT/FR 98/00308

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C12Q1/68 C12N15/82 A01H5/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12Q C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	KINDIGER B ET AL: "assignment of a gene (s) conferring apomixis in Tripsacum to a chromosome arm: Cytological and molecular evidence" GENOME, vol. 39, no. 6, décembre 1996, pages 1133-41, XP002047140 voir le document en entier	1-3
A	---	5-10, 15-22
X	PESSINO S ET AL: "Identification of a maize linkage group related to apomixis in Brachiaria" THEORETICAL AND APPLIED GENETICS, vol. 94, no. 3-4, 1997, pages 439-444, XP002047141 voir le document en entier	1-3
A	---	5-10, 15-22
	--- -/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

26 juin 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

14/07/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Osborne, H

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der. le internationale No  
PCT/FR 98/00308

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	LEBLANC O ET AL: "Reproductive behavior in maize-tripsacum polyploid plants: implications for the transfer of apomixis into maize" JOURNAL OF HEREDITARY, vol. 87, 1966, pages 108-11, XP002069546 voir le document en entier ---	1-3
X	LUBBERS ET AL: "Molecular markers shared by diverse apomictic Pennisetum species" THEOR APPL GENET, vol. 89, 1994, pages 636-42, XP002069547 voir le document en entier ---	1-3
X	LEBLANC O ET AL: "Detection of the apomictic mode of reproduction in Maize-Tripsacum hybrids using maize RFLP" THEORETICAL AND APPLIED GENETICS, vol. 90, no. 7-8, 1995, pages 1198-1203, XP002047142 voir le document en entier ---	1-3
A		5-10, 15-22
A	KOLTUNOW A M: "APOMIXIS: EMBRYO SACS AND EMBRYOS FORMED WITHOUT MEIOSIS OR FERTILIZATION IN OVULES" PLANT CELL, vol. 5, octobre 1993, pages 1425-1437, XP002040861 ---	1-3
A	KINDIGER B ET AL: "A comparison of apomictic reproduction in eastern gammagrass (Tripsacum dactyloides (L.) L.) and Maize - Tripsacum hybrids" GENETICA, vol. 97, no. 1, 1996, pages 103-104, XP002047143 voir le document en entier ---	1-3, 5-10, 15-22
A	RICHARDS A: "Genetic variability in obligate apomicts of the genus Taraxacum" FOLIA GEOBOTANICA PHYTOTAXONOMICA, vol. 31, no. 3, 1996, pages 405-414, XP002047144 voir le document en entier ---	1-3, 5-10, 15-22
P,X	WO 97 11167 A (US GOVERNMENT) 27 mars 1997  voir page 18 - page 49 ---	5,8-10, 15-22
6 P,X	WO 97 10704 A (US GOVERNMENT) 27 mars 1997 voir page 1 - page 14; revendications 1-14 ---	10-22
3	-/--	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De. de internationale No  
PCT/FR 98/00308

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>CHOMET P: "Transposon tagging with mutator" 1994, SPRINGER-VERLAG, NEW YORK, USA, PP 243-49; IN: M. FREELING &amp; V. WALBOT XP002047145 voir le document en entier ---</p>	5-10
A	<p>CHANDLER V: "Overview of cloning genes using transposon tagging" 1994, SPRINGER-VERLAG, NEW YORK USA, PP. 647-52; IN: M. FREELING &amp; V. WALBOT XP002047146 voir le document en entier ---</p>	5-10
T	<p>GRIMANELLI D ET AL: "Mapping diplosporous apomixis in tetraüplöid Tripsacum: one gene or several genes" HEREDITY, vol. 80, 1988, pages 33-39, XP002069584 voir le document en entier -----</p>	1

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Der. le Internationale No

PCT/FR 98/00308

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9711167 A	27-03-1997	US 5710367 A AU 7367396 A	20-01-1998 09-04-1997
WO 9710704 A	27-03-1997	AU 7367496 A	09-04-1997

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**